

kertin, vimentin, Nestin, and NeuN in addition to CD34, and c-Kit. On TEM, the hES and EB cells were very similar to the germ cells. The spontaneously and RA induced differentiating hES cells showed epithelial, mesenchymal and neuronal phenotypes.

Conclusions: From this study, RA induced differentiating hES cells indicated pluripotential differentiation into the three germ layers in addition to neuronal differentiation. However, two weeks culture was not enough to full neuronal differentiation due to no synaptic junctions and synaptic vesicles developed.

P-22 동결-융해된 배아에서의 착상전 유전진단의 결과

김진영¹ · 임천규² · 전진현² · 이형송² · 민동미² · 궁미경¹ · 강인수¹

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 산부인과¹, 불임연구소²

Background & Objectives: 배아의 동결보존은 보조생식술에 있어서 널리 이용되고 있으며, 이는 또한 이식할 수 있는 정상적인 배아의 수가 제한적인 착상전 유전진단에서도 유용하다. 잉여배아를 동결하거나 저반응군에서 여러 주기에 걸쳐 배아를 동결하여 모은 후에 착상전 유전진단을 시행할 수 있다. 착상전 유전진단에서 배아의 할구 세포 생검 전후의 배아동결-융해의 결과에 대해서는 보고가 많지 않은데, 특히 할구 생검 후의 동결-융해는 그 결과가 양호하지 않은 것으로 알려져 있고, 생검 전 동결-융해의 경우에도 일반 착상전 유전진단에서보다 임신율이 낮다고 보고된 바 있다. 따라서 본 연구에서는 동결-융해된 배아로부터 생검된 할구세포에서 FISH나 PCR의 실효성과 동결-융해과정이 할구세포 생검 후의 배아발달에 영향을 주는지 알아보고, 착상전 유전진단의 결과를 알아보려고 하였다.

Method: 2000년 1월부터 2003년 12월까지 착상전 유전진단을 시행한 총 86예의 환자, 319주기를 대상으로 하였다. 환자군을 2군으로 나누어 동결-융해된 배아에서의 착상전 유전진단 군 (33예, 40주기, 평균나이 = 34.2 ± 4.7 세 (mean \pm SD))과 신선한 배아를 이용한 일반 착상전 유전진단 군 (patients = 53, cycles = 279, mean age = 31.8 ± 4.3 yrs.)에서의 결과를 비교하였다. 20주기에서는 잉여배아를 동결하였다가 융해한 후 착상전 유전진단을 시행한 경우였으며, 19주기에서는 과배란의 저반응군으로 몇 주기에 걸쳐 배아를 동결하여 모은 후에 함께 융해하여 착상전 유전진단을 시행한 경우였다. 환자들은 대부분 염색체 진좌나 염색체 이수성의 스크리닝을 위해 착상전 유전진단을 시행하였으며 몇몇 단일 유전자질환으로 인한 경우가 포함되었다. 배란유도는 GnRH agonist와 recombinant FSH를 이용한 황체기 중간 장기요법을 이용하였으며, 저반응군에서는 클로미펜과 gonadotropin 및 GnRH antagonist를 이용하여 시행하였다. 채취된 난자는 미세조작술을 이용하여 수정시켰고, 수정란의 동결은 2PN stage 또는 발달중인 배아단계에서 시행되었다. 동결-융해된 배아 이식에서는 생리주기 2일째부터 estradiol을 투여하고 2PN을 융해하기 1일전부터 progesterone 50 mg씩을 근주하였다. 융해 후 생존한 배아가 6~10세 포기로 발달된 후 1~2개의 할구세포를 채취하여 FISH나 PCR을 이용하여 착상전 유전진단을 시행하였다. 염색체나 유전자적으로 정상으로 진단된 배아는 동결-융해 주기에서는 2PN 융해 후 3일째, 일반주기에서는 난자채취 후 4일째 자궁에 이식되었다. 동결-융해된 배아의 생존율을 알아보고, FISH/PCR를 이용한 진단율, 할구세포 생검 후 배아의 발달 및 착상전 유전진단 후의 임신율 등을 두 군간에 비교하였다.

Results: 동결-융해된 배아의 생존율은 $71.2 \pm 29.8\%$ (mean \pm SD)였다. FISH 또는 PCR 분석을 통해 진단이 가능했던 경우는 동결-융해 배아에서는 $88.1 \pm 22.0\%$ 에서, 일반 배아에서는 $95.2 \pm 10.3\%$ 으로 유의한 차이는 없었다. 이식할 수 있는 정상 배아의 비율 역시 두 군간에 차이가 없었다 ($21.6 \pm 19.7\%$ vs. $27.4 \pm 18.8\%$; $p > 0.05$). 할구세포 생검 후 발달이 잘 진행된 배아의 비율은 동결-융해 군에서 $62.0 \pm 26.5\%$, 일반 군에서 $66.4 \pm 26.1\%$ 로 두 군간에 유의한 차이는 없었다 ($p > 0.05$). 이식 주기당 임상적 임신율은 동결-융해 군에서는 11.4% (4/35)였으며, 신선배아를 이용한 일반 군에서 21.3% (57/267)로 통계적으로 유의하지는 않았으나 낮은 경향을 보였다.

Conclusions: 본 연구의 결과로 동결-융해된 배아에서의 할구세포 생검 및 이를 이용한 FISH/PCR 분석은 융해된 배아가 잘 생존한다면 신선한 배아에서와 차이 없이 실효성이 있으며, 할구세포 생검 후 배아의 발달도 동결-융해 과정의 영향을 받지 않는 것으로 생각된다. 그러나 착상전 유전진단의 임신율은 동결-융해된 배아에서 낮은 경향을 보였다. 따라서 잉여배아가 있는 경우나 저반응군에서 배아의 수집을 위해서 배아를 동결한 후 융해하여 착상전 유전진단을 유용하게 적용할 수 있으며, 향후 할구세포 생검 전후에 적용할 수 있는 보다 적절한 동결-융해조건을 확립하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

P-23 Endothelial Differentiation from Mouse Embryonic Stem Cells

Kyu-Hyung Park, Hey-Jin Lee¹, Gyu-Seek Rhee²,
Kwang-Yul Cha¹, Hyung-Min Chung¹

¹Cell and Gene Therapy Research Institute, Pochon CHA University, Seoul 135-081, Korea,

²National Institute of Toxicology Research, Korea Food & Drug Administration

Background & Objectives: Embryonic stem (ES) cells, first derived from the inner cell mass of mouse blastocysts. Pluripotent ES cells may represent a suitable in vitro model to study vascular development which is difficult to study in experimental animal systems. Recent studies of mutant mice specified a set of molecules involved in vascular development. Among these molecules, VEGF, Flk-1, and VE-cadherin were proven to be requisite for vasculogenesis. Several in vitro systems have been developed for investigating the cellular events in vasculogenesis. The most popular systems are embryoid body formation. Although these culture systems enable to investigate vasculogenesis virtually as it occurs in embryos, the existence of many other lineage cells generated in an uncontrollable manner hinders understanding of the behavior of endothelial cells. Here, we develop to more simple and mass culture system of mouse ES cells to differentiate endothelial cell lineage.

Method: Cell Culture Undifferentiated mouse D3 ES cells were cultured and used for this studies. Briefly, D3 ES cells were co-cultured with mitomycin inactivated MEF cells in media containing DMEM, 15% FBS and 1,000unit/ml of mouse LIF. Endothelial cell differentiation To initiate ES cell differentiation and EBs formation. Cultures were maintained on EBM2, 5% FBS, VEGF, bFGF, IGF-1, EGF, and ascorbic acid without further feeding for up to 11 days, EBs were collected at different days of differentiation.